

AccuProbe®

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
CULTURE IDENTIFICATION TEST
(bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865)

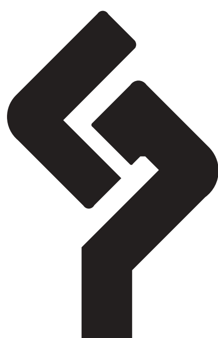
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
KULTURBESTÄTIGUNGSTEST
(bioMérieux Best.Nr. 39204 / Gen-Probe Kat. Nr. 102865/2865)

TEST D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS
PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE
(bioMérieux réf. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865)

TEST DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS
PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO
(bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865)

TEST DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS
PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA
(bioMérieux cod. 39204 / Gen-Probe Cat. N. 102865/2865)

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE
IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA
(bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865)





English

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST

FOR EXPORT USE ONLY

(bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865)

INTENDED USE

The AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST is a rapid DNA probe test which utilizes the technique of nucleic acid hybridization for the identification of *Streptococcus pneumoniae (Pneumococcus)* isolated from culture.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) is the leading cause of community acquired bacterial pneumonia in the United States, occurring in approximately one half million cases per year, with a complication and death rate of about 5% (2, 4). It is also the leading cause of otitis media and bacteremia in infants and children (2). *S. pneumoniae* is a common cause of meningitis and has been isolated from patients with conjunctivitis, sinusitis, mastoiditis, pericarditis, occult bacteremia, arthritis, and endocarditis (2). It is the third most common blood culture isolate found (6). *S. pneumoniae* may be considered as part of the normal flora of the upper respiratory tract, however, infants, the elderly, and debilitated patients with other compromising medical conditions of the respiratory tract, or decreased immunological function are at greatest risk for acquiring pneumococcal disease (2, 3, 4).

Presumptive identification is made by traditional physiological and biochemical methods. These include colony morphology, Gram stain, catalase reaction, alpha hemolytic activity on 5% sheep blood agar, optochin susceptibility, and bile solubility (2). More than 80 serotypes have been identified, based on capsular polysaccharides. The Quellung test, based on apparent capsular swelling in response to treatment with antisera to these polysaccharides, is another means of identification. All tests mentioned above are subjective, and no one by itself provides unequivocal identification of *S. pneumoniae.*

The AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST offers a rapid, nonsubjective method for the definitive identification of *S. pneumoniae* based on the detection of specific ribosomal RNA sequences that are unique to *S. pneumoniae*.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Nucleic acid hybridization tests are based on the ability of complementary nucleic acid strands to specifically align and associate to form stable double-stranded complexes (5). The AccuProbe SYSTEM uses a single-stranded DNA probe with a chemiluminescent label that is complementary to the ribosomal RNA of the target organism. After the ribosomal RNA is released from the organism, the labeled DNA probe combines with the target organism's ribosomal RNA to form a stable DNA:RNA hybrid. The Selection Reagent allows for the differentiation of non-hybridized and hybridized probe. The labeled DNA:RNA hybrids are measured in the GEN-PROBE luminometer. A positive result is a luminometer reading equal to or greater than the cut-off. A value below this cut-off is a negative result.

REAGENTS

Reagents for the AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST are provided in three separate reagent kits:

AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE PROBE KIT

Probe Reagent (P) *Streptococcus pneumoniae*.	(10 x 2 tubes)

AccuProbe CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

Reagent 1 (Lysis Reagent) (1) Buffered solution containing 0.04% sodium azide.	1 x 10 mL
Reagent 2 (Hybridization Buffer) (2) Buffered solution.	1 x 10 mL
Reagent 3 (Selection Reagent) (3) Buffered solution.	1 x 60 mL

GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT

Detection Reagent I (RI) 0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N nitric acid.	1 x 240 mL
Detection Reagent II (RII) 1 N sodium hydroxide.	1 x 240 mL

WARNINGS AND PRECAUTIONS

A. For *in vitro* diagnostic use.

B. Use universal precautions when performing this assay (1).

C. Use only for the identification of *Streptococcus pneumoniae* isolated from culture.

D. Use only supplied or specified disposable laboratory ware.

E. Reagents in this kit contain sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. Upon disposal of these reagents, always dilute the material with a large volume of water to prevent azide buildup in the plumbing.

F. Avoid contact of Detection Reagents I and II with skin, eyes and mucous membranes. Wash with water if these reagents come into contact with skin. If spills of these reagents occur, dilute with water before wiping dry.

STORAGE AND HANDLING REQUIREMENTS

Probe Reagent Tubes must be stored in the foil pouches at 2° to 8°C. The Probe Reagent Tubes are stable in the unopened pouches until the expiration date indicated. Once opened, the pouch should be resealed and the tubes should be used within two months and prior to the expiration date.

Other reagents used in the AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST may be stored between 2° and 25°C and are stable until the expiration date indicated.

DO NOT FREEZE THE REAGENTS.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

The AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST is designed to determine the identity of *S. pneumoniae* isolated from culture.

A. **Solid Media Method.** Growth from appropriate solid media, such as 5% Sheep Blood Agar with morphology suggestive of *S. pneumoniae* may be tested. Samples may be tested as soon as the growth is visible, but should be less than 48 hours old.

1. Discrete colonies can be taken off the solid media with a 1 µL disposable plastic loop, a wire loop, a disposable plastic needle, or an applicable stick. Swabs should not be used due to the small volume of liquid in which the cells are subsequently resuspended.
2. If a single colony is to be tested, it should be at least 1 mm in diameter. Alternatively, several (3 to 4) smaller colonies can be tested. DO NOT USE CONFLUENT GROWTH.
3. Avoid taking any of the solid media with the cells.
4. The operator may elect to inoculate another culture plate at this time to confirm the purity of the isolate.

B. **Broth Culture Method**. Appropriate broth cultures, such as Trypticase Soy or Brain Heart Infusion with turbidity equivalent to or greater than a McFarland 1 Nephelometer Standard may be tested. Broth cultures, incubated for up to 24 hours at 37°C, may be used. Pipette a 50 µL sample from the well mixed broth suspension into the Probe Reagent Tubes, as described below.

MATERIALS PROVIDED

The ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST
bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865

	20 Tests
Probe Reagent (P)	10 x 2 tubes

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1 µL plastic sterile inoculating loops, wire loops, plastic needles, or applicator sticks for selecting colonies
Control culture strains
Water bath or Dry Heat Bath* (60° ± 1°C)
Micropipettes (50 µL, 300 µL)
Re-pipettor (50 µL, 300 µL)
Vortex mixer

*Heating blocks in the dry heat bath should have wells that are correctly sized for 12 x 75 mm tubes. The use of GEN-PROBE dry heat baths is recommended.

AVAILABLE FROM YOUR GEN-PROBE DISTRIBUTOR

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)
Dry Heat Bath (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)
ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)
GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791-1791)

TEST PROCEDURE

A. EQUIPMENT PREPARATION

1. Adjust the water bath or dry heat bath to 60° ± 1°C.

2. Prepare the GEN-PROBE luminometer for operation. Make sure there is sufficient volume of Detection Reagents I and II to complete the tests. If sufficient reagents are not contained in the reservoirs, fill the reservoirs according to the instructions in the Operator's Manual.

B. CONTROLS

Positive and negative control strains should be tested routinely in each laboratory according to local regulations. A culture of *Streptococcus pneumoniae* (e.g., American Type Culture Collection, ATCC #33400) may be used as the positive control while a culture of *Streptococcus bovis* (e.g., ATCC #33317) may be used as the negative control.

C. SAMPLE PREPARATION

1. Open the foil pouch by cutting evenly across the top of the pouch. Remove enough Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Reseal the pouch by folding the opened edge over several times and securing with adhesive tape or a clip. **Leave the desiccant pillow in the pouch.**

2. Label a sufficient number of Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Remove and retain the caps.

3. Pipette 50 µL of Reagent 1 (Lysis Reagent) into all Probe Reagent Tubes. **If broth cultures are to be tested, do not add Reagent 1 to the Probe Reagent Tubes.**

4. Transfer a 1 mm colony or several smaller colonies from the solid media or 50 µLof a well mixed broth culture into the Probe Reagent Tubes as described in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. Twirl the loop, needle or stick in Reagent 1 (Lysis Reagent) to remove the cells if testing growth from solid media and mix thoroughly.

D. HYBRIDIZATION

1. Pipette 50 µL of Reagent 2 (Hybridization Buffer) into all Probe Reagent Tubes. Recap the Probe Reagent Tubes and mix by shaking or vortexing.

2. Incubate for 15 minutes at 60° ± 1°C in a water bath or dry heat bath.

E. SELECTION

1. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block. Remove and retain the caps. Pipette 300 µL of Reagent 3 (Selection Reagent) into each tube. Recap the tubes and VORTEX them to mix completely.

2. Incubate the Probe Reagent Tubes for 5 minutes at 60° ± 1°C in a water bath or dry heat bath.

3. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block and leave them at room temperature for at least 5 minutes. Remove and discard the caps. **Read the results in the luminometer within 1 hour after removing from the water bath or dry heat bath.**

F. DETECTION

1. Select the appropriate protocol from the menu of the luminometer software.

2. Using a damp tissue or paper towel, wipe each tube to ensure that no residue is present on the outside of the tube and insert the tube into the luminometer according to the instructions directions.

3. When the analysis is complete, remove the tube(s) from the luminometer.

English

PROCEDURAL NOTES

A. REAGENTS: Reagent 2 (Hybridization Buffer) may precipitate at 2° to 8°C. Warming and mixing the solution at 35° to 60°C will dissolve the precipitate.

B. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION: It is important to sample growth from an area of the solid media where there are isolated colonies.

C. TEMPERATURE: The Sample Preparation, Hybridization and Selection reactions are temperature dependent. Therefore, it is imperative that the incubator, water bath or dry heat bath is maintained within the specified temperature range.

D. TIME:

1. The Hybridization Reaction should be started within 30 minutes of adding the cells and Reagent 1 to the Probe Reagent Tubes.

2. The Hybridization and Selection reactions are time dependent. Hybridize at least 15 minutes but no more than 20 minutes. Incubate the Probe Reagent Tubes during the SELECTION Step for at least 5 minutes but no more than 6 minutes.

E. WATER BATH: The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the entire liquid reaction volume in the Probe Reagent Tubes is submerged, but should not be so high that the water might enter the tubes.

F. VORTEXING: It is critical to have a homogeneous mixture during the SELECTION Step, specifically after the addition of Reagent 3.

G. TROUBLE-SHOOTING:

1. Elevated negative control values (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317) greater than 20,000 RLU (Relative Light Units) in the LEADER or 600 PLU (Photometric Light Units) in the AccuLDR (formerly PAL) can be caused by insufficient mixing after adding Reagent 3 (Selection Reagent) or by testing mixed cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.

2. Low positive control values (*Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400) less than 50,000 RLU or 1,500 PLU in the AccuLDR (formerly PAL) can be caused by insufficient cell numbers, by testing mixed or aged cultures, or by leaving cells in Reagent 1 more than 30 minutes before adding Reagent 2. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.

RESULTS

A. INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST are based on the following cut-off values. Samples producing signals greater than or equal to these cut-off values are considered positive. Signals less than these cut-off values are considered negative. Results in repeat ranges should be repeated.

	AccuLDR (formerly PAL)	**LEADER**
Cut-off value	1,500 PLU	50,000 RLU
Repeat range	1,200-1,499 PLU	40,000-49,999 RLU

B. QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

Negative control (e.g., *Streptococcus bovis*, ATCC #33317) and positive control (e.g., *Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400) should satisfy the following values:

	AccuLDR (formerly PAL)	**LEADER**
Negative control	< 600 PLU	< 20,000 RLU
Positive control	> 1,500 PLU	> 50,000 RLU

LIMITATIONS

This method has been tested using fresh growth from solid media and from broth cultures listed in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. The efficacy of this test has not been demonstrated on direct clinical specimens.

Results from the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

EXPECTED VALUES

The ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to standard culture biochemical identification methods at two sites using a total of 662 clinical isolates. Of these, 305 were *S. pneumoniae* isolates, 185 were isolates of other *Streptococcus* species, 172 were other microbial isolates representing 25 genera. Standard identification methods included Gram stain, colony morphology, catalase reaction, hemolytic activity on 5% sheep blood agar, optochin susceptibility, and bile solubility. The isolates were categorized as either positive (≥ 50,000 RLU) or negative (< 50,000 RLU). The range of observations for negative culture isolates was 344 to 32,911 RLU and 59,223 to 863,193 RLU for positive cultures. A comparison of the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST and standard culture identification methods is shown below.

ACCUPROBE / CULTURE IDENTIFICATION

ACCUPROBE	**Pos**	**Pos**	**Neg**	**Neg**	**Sensitivity/**	**Percent**
Culture	**Pos**	**Neg**	**Pos**	**Neg**	**Specificity**	**Agreement**
Site 1	202	0	0	212	100%/100%	100%
Site 2	103	0	0	145	100%/100%	100%
Total	**305**	**0**	**0**	**357**	**100%/100%**	**100%**

All *S. pneumoniae* isolates produced a positive result and all other clinical isolates representing a phylogenetic cross-section of organisms produced a negative result with the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. The percent sensitivity, percent specificity, and percent agreement for the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST compared to standard culture identification methods is 100%.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. WITHIN-RUN PRECISION

The within-run precision of the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST was calculated by assaying two concentrations of ribosomal RNA isolated from *S. pneumoniae* using 10 replicates in a single assay.

Sample	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	101,292	56,025
Standard Deviation	4,293	1,743
Coefficient of Variation	4.2%	3.1%

B. BETWEEN-RUN PRECISION

The between-run precision was calculated by assaying the same two concentrations of *S. pneumoniae* ribosomal RNA using single determinations in 12 consecutive runs.

Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	101,322	53,288
Standard Deviation	3,660	1,776
Coefficient of Variation	3.6%	3.3%

C. SPECIFICITY

A total of 95 ATCC reference isolates were evaluated using the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 78 species from 51 genera. Five isolates of *S. pneumoniae*, 24 isolates of 13 other *Streptococcus* species and 66 isolates of 50 other genera representing a phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. All *S. pneumoniae* isolates tested produced positive results using the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. Other *Streptococcus* species and the representative phylogenetic cross-section of species did not react using this kit.

D. RECOVERY

Seven serial dilutions of *S. pneumoniae* cells ranging from 3 thousand to 30 million cells per assay were tested in the presence of 30 million cells of the following non-target species: *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus bovis*. The presence of these non-target species did not interfere with the positive signal of the *S. pneumoniae* cell dilutions, nor did they generate a positive reaction with the ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST.



GEN-PROBE

AccuProbe

Deutsch

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST

(bioMérieux Best.Nr. 39204 / Gen-Probe Kat. Nr. 102865/2865)

VERWENDUNGSZWECK

Der AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist ein DNA-Sonden-Schnelltest, der nach dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung arbeitet und die Identifizierung von *Streptococcus pneumoniae (Pneumococcus*) aus Kulturisolaten ermöglicht.

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) ist die Hauptursache für die bakterielle, ambulant erworbene Pneumonie in den Vereinigten Staaten mit jährlich etwa einer halben Million Fälle und einer Komplikations- und Todesrate von ca. 5% (2, 4). Dieser Keim ist auch die Hauptursache für Otitis media und Bakteriämie bei Säuglingen und Kindern (2). *S. pneumoniae* ist eine häufige Ursache für Meningitis und wurde bei Patienten mit Konjunktivitis, Sinusitis, Mastoiditis, Pericarditis, okkulter Bakteriämie, Arthritis und Endokarditis gefunden (2). Es ist der dritthäufigste Erreger, der aus Blutkulturen isoliert wird (6). Obwohl *S. pneumoniae* als Teil der Normalflora des oberen Respirationstraktes angesehen werden kann, sind Säuglinge sowie ältere und geschwächte Patienten mit anderen Erkrankungen des Respirationstrakts oder geschwächtem Immunsystem besonders anfällig für Pneumokokkenerkrankungen (2, 3, 4).

Eine vorläufige Identifizierung erfolgt durch klassische physiologische und biochemische Methoden. Dazu gehören Koloniemorphologie, Gramfärbung, Katalasereaktion, α-Hämolyse auf 5%igem Hammelblutagar, Empfindlichkeit für Optochin und Gallelöslichkeit (2). Mehr als 80 Serotypen wurden auf der Basis der Kapselpolysaccharide identifiziert. Eine weitere Methode der Identifizierung ist die Quellungsreaktion, bei der eine Kapselschwellung als Reaktion auf eine Behandlung mit Antiseren sichtbar wird. Bei allen genannten Tests handelt es sich um subjektive Methoden, von denen keine eine eindeutige Identifizierung von *S. pneumoniae* ermöglicht.

Der AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist eine schnelle, objektive Methode zur sicheren Identifizierung von *S. pneumoniae.* Die Identifizierung beruht auf dem Nachweis von rRNA Sequenzen, die für *S. pneumoniae* spezifisch sind.

PRINZIP

Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (5). Der AccuProbe Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das GEN-PROBE luminometer mißt das von den DNA-RNA-Hybriden abgegebene Lichtsignal. Ein

positives Ergebnis liegt vor, wenn der vom luminometer angezeigte Wert gleich oder größer ist als der Grenzwert (cut-off). Liegt der Wert unterhalb dieses Grenzwertes, ist das Ergebnis negativ.

REAGENZIEN

Die Reagenzien des AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden in drei separaten Kits geliefert:

AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE SONDEN-TESTKIT

Sondenreagenz (P) *Streptococcus pneumoniae.*	(10 x 2 Röhrchen)

AccuProbe KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZIENKIT

Reagenz 1 (Lysereagenz) (1) Pufferlösung mit 0,04% Natriumazid.	1 x 10 ml
Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) (2) Pufferlösung.	1 x 10 ml
Reagenz 3 (Selektionsreagenz) (3) Pufferlösung.	1 x 60 ml

GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZIEN-KIT

Detektionsreagenz I (RI) 0,1% Wasserstoffperoxid in 0,001 N Salpetersäure.	1 x 240 ml
Detektionsreagenz II (RII) 1 N Natriumhydroxyd.	1 x 240 ml

VORSICHTSMASSNAHMEN

A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.

B. Beachten Sie bei der Testdurchführung die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (1).

C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von *Streptococcus pneumoniae* aus Kulturisolaten.

D. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.

E. Die Reagenzien dieses Kits enthalten Natriumazid, das mit Blei- oder Kupferrohren zu explosiven Metallaziden reagieren kann. Beim Ableiten in die Kanalisation sollten die Reagenzien immer mit reichlich Wasser verdünnt werden.

F. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten einer dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.

LAGERUNG

Die Sondenreagenzröhrchen bei 2° - 8°C in den Aluminiumbeuteln lagern. Die original verpackten Sondenreagenzröhrchen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen des Beutels sind die Röhrchen 2 Monate, längstens jedoch bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Beutel müssen nach jedem Gebrauch wieder fest verschlossen werden.

Die übrigen Reagenzien des AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

DIE REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Der AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von *S. pneumoniae* aus Kulturisolaten.

A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen von geeigneten Festmedien wie 5%iger Hammelblutagar mit *S. pneumoniae*-verdächtiger Morphologie. Die Kulturen können getestet werden, sobald Wachstum sichtbar ist. Sie sollten nicht älter als 48 Stunden sein.

   1. Einzeln liegende Kolonien mit einer 1 µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse oder einer Einweg-Plastiknadel abnehmen. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Zellen anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
   2. Wird eine einzelne Kolonie getestet, sollte diese einen Durchmesser von mindestens 1 mm haben. Alternativ können mehrere (3-4) kleinere Kolonien getestet werden. VERWENDEN SIE KEINE KONFLUIERENDEN KOLONIEN.
   3. Achten Sie darauf, daß beim Abnehmen der Zellen kein Nährboden mit abgenommen wird.
   4. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit der entnommenen Probe zu überprüfen.

B. **Flüssige Kulturmedien.** Der Test kann mit geeigneten Flüssigkulturen wie Trypcase-Soja- oder Hirn-Herz-Bouillon durchgeführt werden, deren Trübung größer oder gleich McFarland Standard 1 ist. Es können Bouillonkulturen, die bis zu 24 Stunden bei 37°C inkubiert wurden, verwendet werden. Pipettieren Sie 50 µl Probe aus dem gut gemischten Flüssigkulturmedium in die Sondenreagenzröhrchen, wie im Abschnitt TESTDURCHFÜHRUNG unter VORBEREITUNG DER PROBEN beschrieben.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST

bioMérieux Best.Nr. 39204 / Gen-Probe Kat. Nr. 102865/2865

	20 Tests
Sondenreagenz (P)	10 x 2 Röhrchen

ERFORDERLICHE MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

Sterile 1 µl Plastikösen, Metallösen oder Plastiknadeln zum Abimpfen der Kolonien.
Kontroll-Kulturstämme
Wasserbad oder Heizblock* (60° ± 1°C)
Mikropipetten (50 µl, 300 µl)
Repetierpipetten (50 µl, 300 µl)
Vortex

* Die Heizblöcke müssen für 12 x 75 mm Röhrchen geeignet sein. Es wird daher empfohlen, die Heizblocksysteme von GEN-PROBE zu verwenden.

ZUSÄTZLICHE VERFÜGBARE MATERIALIEN

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer
    (bioMérieux Best.Nr. 39400 / Gen-Probe Kat. Nr. 103100i/3100i)
Heizblock (60° ± 1°C)
    (bioMérieux Best.Nr. 39406 / Gen-Probe Kat. Nr. 3397)
AccuProbe REAGENZIENKIT KULTURBESTÄTIGUNG

Deutsch

(bioMérieux Best.Nr. 39305 / Gen-Probe Kat. Nr. 102800/2800)
GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZIEN-KIT
(bioMérieux Best.Nr. 39300 / Gen-Probe Kat. Nr. 201791-1791)

TESTDURCHFÜHRUNG

A. VORBEREITUNG DER GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Stellen Sie das Wasserbad oder den Heizblock auf 60° ± 1°C ein.
2. Bereiten Sie das GEN-PROBE luminometer für die Messung vor. Vergewissern Sie sich, daß für die Durchführung der Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist. Ist dies nicht der Fall, füllen Sie die Behälter gemäß den Anweisungen im Handbuch.

B. KONTROLLEN

In jedem Labor sollten gemäß den örtlichen Bestimmungen routinemäßig positive und negative Kontrollstämme mitgeführt werden. Als Positivkontrolle kann eine *Streptococcus pneumoniae* Kultur (z.B. American Type Culture Collection, ATCC #33400) dienen, während eine *Streptococcus bovis* Kultur (z.B. ATCC #33317) als Negativkontrolle verwendet werden kann.

C. PROBENVORBEREITUNG

1. Die Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Kulturisolate und/oder Kontrollen erforderliche Anzahl an Sondenreagenzröhrchen. Den Beutel an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer wieder dicht verschließen. **Den Trockenbeutel nicht herausnehmen.**
2. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Sondenreagenzröhrchen für die Kulturisolate und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 1 (Lysereagenz) in alle Sondenreagenzröhrchen. **Geben Sie kein Reagenz 1 in die Sondenreagenzröhrchen, wenn Flüssigkulturen getestet werden**.
4. Überführen Sie eine 1 mm große Kolonie oder mehrere kleinere Kolonien vom festen Medium oder 50 µl einer gut gemischten Flüssigkultur in die Sondenreagenzröhrchen, wie im Abschnitt PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG beschrieben. Bei Proben von festen Kulturmedien wirbeln Sie die Öse oder Nadel in Reagenz 1 (Lysereagenz), so daß möglichst viele Zellen in das Röhrchen übertragen werden und mischen Sie gründlich.

D. HYBRIDISIERUNG

1. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) in alle Sondenreagenzröhrchen. Verschließen Sie die Sondenreagenzröhrchen und mischen Sie den Inhalt durch Schütteln oder Vortexen.
2. Inkubieren Sie für 15 min bei 60° ± 1°C im Wasserbad oder Heizblock.

E. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300 µl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese, um den Inhalt gleichmäßig zu durchzumischen.
2. Inkubieren Sie die Sondenreagenzröhrchen für 5 min bei 60° ± 1°C im Wasserbad oder

Heizblock.

3. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen und verwerfen Sie diese. **Die Röhrchen sollten innerhalb 1 Stunde nachdem Sie aus dem Wasserbad oder Heizblock entfernt wurden, gemessen werden.**

F. DETEKTION

1. Wählen Sie auf dem luminometer das geeignete Programm.
2. Zur Säuberung der Röhrchenwand sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrchenmaterial selbst, sollte jedes Röhrchen vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt werden. Stellen Sie die Röhrchen gemäß den Anweisungen im Handbuch in das luminometer.
3. Nehmen Sie die Röhrchen nach der Messung aus dem luminometer.

Deutsch

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) kann bei 2° - 8°C präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags das Reagenz auf 35° - 60°C erhitzen und mischen.

B. PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG: Es ist wichtig, daß die Kultur vom Festmedium an einer Stelle abgenommen wird, an der die Kolonien einzeln liegen.

C. TEMPERATUR: Probenvorbereitung, Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängig. Es muß deshalb unbedingt darauf geachtet werden, daß der Brutschrank, das Wasserbad oder der Heizblock im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.

D. ZEIT:

1. Die Hybridisierungsreaktion sollte innerhalb 30 min nach Zugabe der Zellen und Reagenz 1 in die Sondenreagenzröhrchen gestartet werden.
2. Die Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die Sondenreagenzröhrchen während des Selektionsschrittes mindestens 5 min, jedoch nicht länger als 6 min inkubieren.

E. WASSERBAD: Achten Sie darauf, daß der Wasserstand ausreichend hoch bleibt, so daß sich die gesamte Reaktionslösung der Sondenreagenzröhrchen im Wasser befindet, aber kein Wasser in die Röhrchen gelangen kann.

F. VORTEXEN: Während des Arbeitsschrittes SELEKTION muß besonders darauf geachtet werden, daß die Probenmischung absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe von Reagenz 3.

G. FEHLERMÖGLICHKEITEN:

1. Bei Messungen mit dem LEADER können erhöhte negative Kontrollwerte (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317) über 20.000 RLU (Relative Light Units) durch nicht ausreichendes Mischen nach Zugabe von Reagenz 3 (Selektionsreagenz) gemessen werden. Entsprechendes gilt bei Messungen mit dem AccuLDR (vormals PAL), wenn dort erhöhte negative Kontrollwerte über 600 PLU (Photometric Light Units) gemessen werden. Ein ähnlicher Effekt kann beim Testen von Mischkulturen auftreten. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium überimpfen und inkubieren.
2. Schwach positive Kontrollwerte (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317) unter 50.000 RLU auf dem LEADER oder 1.500 PLU auf dem AccuLDR (vormals PAL) erhält man bei zu geringen

Keimzahlen oder durch Testen von Mischkulturen oder zu alter Kulturen oder wenn die Zellen in Reagenz 1 länger als 30 min stehen bleiben, bevor Reagenz 2 zugegeben wird. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium überimpfen und inkubieren.

ERGEBNISSE

A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden auf der Basis folgender Grenzwerte (cut-off) interpretiert. Proben, deren Lichtsignale diesen Grenzwerten entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Signale unterhalb dieser Grenzwerte werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden.

	AccuLDR (vormals PAL)	**LEADER**
Grenzwert	1.500 PLU	50.000 RLU
Graubereich	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

Die Negativkontrolle (z. B. *Streptococcus bovis*, ATCC #33317) und die Positivkontrolle (z.B. *Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400) müssen folgenden Sollwerten entsprechen:

	AccuLDR (vormals PAL)	**LEADER**
Negativkontrolle	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Positivkontrolle	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITIERUNGEN

Diese Methode wurde mit frischen Kulturen getestet, die auf den im Abschnitt PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG angegebenen Festmedien und Flüssigkulturen angezüchtet wurden. Die Performance dieses Tests bei direkter Testung von klinischen Proben wurde nicht evaluiert.

Die Ergebnisse des AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

NORMALWERTE

Der AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde in 2 Laboratorien mit klassischen Kulturverfahren mit biochemischer Identifizierung verglichen. Insgesamt wurden 662 klinische Isolate getestet. Dabei handelte es sich um 305 *S. pneumoniae* Isolate, 185 Isolate von anderen *Streptococcus* Spezies und 172 andere mikrobiologische Spezies aus 25 Gattungen. Die klassischen Identifizierungsmethoden umfaßten die Gramfärbung, Koloniemorphologie, Katalasereaktion, Hämolyse auf 5%igem Hammelblutagar, Optochinempfindlichkeit und Gallelöslichkeit. Die Stämme wurden entweder als positiv (≥ 50.000 RLU) oder negativ (< 50.000 RLU) bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 344 bis 32.911 RLU und für die positiven Kulturen ein Bereich von 59.223 bis 863.193 RLU ermittelt. Ein Vergleich des AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS mit den klassischen Identifizierungsmethoden ist im folgenden angegeben.

ACCUPROBE / KULTUR

ACCUPROBE	Pos	Pos	Neg	Neg	Sensitivität/	Proz.
Kultur	Pos	Neg	Pos	Neg	Spezifität	Korr.
Labor 1	202	0	0	212	100%/100%	100%
Labor 2	103	0	0	145	100%/100%	100%
Gesamt	**305**	**0**	**0**	**357**	**100%/100%**	**100%**

Bei der Testung mit dem ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST reagierten alle *S. pneumoniae* Isolate positiv und alle anderen klinischen Isolate, die einen phylogenetischen Querschnitt der Organismen darstellten, negativ. Die prozentuale Sensitivität, die prozentuale Spezifität und die prozentuale Korrelation des ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS im Vergleich zu klassischen Identifizierungsmethoden beträgt 100%.

Deutsch

PERFORMANCE

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS wurden zwei Konzentrationen der rRNA von *S. pneumoniae* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert (RLU)	101.292	56.025
Standardabweichung	4.293	1.743
Variationskoeffizient	4,2%	3,1%

B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden die beiden gleichen Konzentrationen der rRNA von *S. pneumoniae* in Einzelbestimmungen in 12 aufeinanderfolgenden Testserien bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert (RLU)	101.322	53.288
Standardabweichung	3.660	1.776
Variationskoeffizient	3,6%	3,3%

C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 95 ATCC Referenzstämme mit dem ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Bei diesen Stämmen handelte es sich um insgesamt 78 Spezies aus 51 Gattungen. 5 *S. pneumoniae* Stämme, 24 Stämme von 13 anderen *Streptococcus* Spezies und 66 Stämme von 50 anderen Gattungen, die einen phylogenetischen Querschnitt von Organismen darstellten, wurden mit dem ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST evaluiert. Alle *S. pneumoniae* Stämme reagierten mit dem ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST positiv. Andere *Streptococcus* Spezies und die Spezies aus dem repräsentativen phylogenetischen Querschnitt reagierten mit diesem Test nicht.

D. WIEDERFINDUNG

Sieben *S. pneumoniae* Verdünnungsreihen (von 3000 bis 30 Millionen Zellen pro Test) wurden in Gegenwart von 30 Millionen Zellen getestet, die zu *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus bovis* gehörten (keine Zielspezies). Die Anwesenheit dieser Spezies interferierte nicht mit dem positiven Lichtsignal von *S. pneumoniae* Zellverdünnungen und ergaben keine positive Reaktion mit dem AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST.



TEST D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE

(bioMérieux réf. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865)

UTILISATION

Le TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE est un test d'identification rapide par sonde ADN de *S. pneumoniae (Pneumococcus)* isolé à partir d' une culture. Ce test utilise la technique d'hybridation des acides nucléiques.

INTRODUCTION

Aux Etats-Unis, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae)* est le principal responsable des pneumopathies bactériennes communautaires, avec approximativement un demi - million de cas par an, des complications et la mort survenant pour environ 5% d'entre eux (2, 4). Il est également la cause de la plupart des otites et des bactériémies chez le nourrisson et l'enfant (2). *S. pneumoniae* est fréquemment responsable de méningites et a été isolé chez des patients atteints de conjonctivite, de sinusite, de mastoïdite, de péricardite, de bactériémie latente, d'arthrite et d'endocardite (2). Il est au troisième rang des germes isolés par hémoculture (6). Bien que *S. pneumoniae* puisse être considéré comme un hôte commensal des voies aériennes supérieures chez le sujet sain, les nourrissons, les sujets âgés et les patients fragilisés par d'autres affections respiratoires, ou immuno-déprimés, représentent un terrain particulièrement favorable au développement d'une infection pneumococcique (2, 3, 4).

Les méthodes traditionnelles physiologiques et biochimiques permettent de faire des identifications par présomption. Celles-ci comprennent l'étude morphologique de la colonie, l'examen après coloration de Gram, la recherche de catalase, l'analyse de l'activité α-hémolytique sur gélose à 5% de sang de mouton, l'étude de la sensibilité à l'optochine et de la solubilité dans la bile (2). L'étude des polysaccharides capsulaires a permis d'identifier plus de 80 sérotypes. Le test de Quellung est une autre méthode possible d'identification; il repose sur l'observation du gonflement capsulaire apparent en réponse au traitement par un antisérum. Toutefois, tous les tests mentionnés ici sont subjectifs, et aucun d'entre eux ne permet une identification formelle de *S. pneumoniae.*

Le TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE est un test rapide et objectif permettant l'identification formelle de *S. pneumoniae*, grâce à la détection de séquences d'ARN ribosomal qui lui sont spécifiques.

PRINCIPE

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaires stables (5). La méthode AccuProbe utilise une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimiluminescent complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) de l'organisme cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN-ARN stable. Le Réactif de Sélection

Français

permet de différencier les sondes hybridées des sondes non hybridées. Le luminomètre GEN-PROBE permet de mesurer le signal lumineux émis par les hybrides ADN-ARN. Le résultat est positif si le luminomètre indique une valeur supérieure ou égale à la valeur seuil; il est négatif s'il indique une valeur inférieure.

RÉACTIFS

Les réactifs utilisés pour le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts:

COFFRET SONDE POUR STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ACCUPROBE

Réactif Sonde (P) (10 x 2 tubes)
Streptococcus pneumoniae.

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURE ACCUPROBE

Réactif 1 (Réactif de Lyse) (1) 1 x 10 ml
Solution tamponnée contenant 0,04% d'azide de sodium.

Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) (2) 1 x 10 ml
Solution tamponnée.

Réactif 3 (Réactif de Sélection) (3) 1 x 60 ml
Solution tamponnée.

COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE

Réactif de Détection I (RI) 1 x 240 ml
0,1% d'eau oxygénée dans une solution d'acide nitrique 0,001 N.

Réactif de Détection II (RII) 1 x 240 ml
Hydroxide de sodium 1 N.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

A. Pour diagnostic *in vitro* uniquement.

B. Observer les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test (1).

C. A utiliser uniquement pour l'identification de *S. pneumoniae* isolé à partir d' une culture.

D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel à usage unique.

E. Les réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium susceptible de former, par réaction avec le plomb ou le cuivre des canalisations, des azides métalliques explosifs. Lors de l'évacuation de ces réactifs, prendre soin de toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azide dans la plomberie.

F. Eviter le contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer à l'eau avant d'essuyer.

CONSERVATION

Les tubes de Réactif Sonde doivent être conservés dans les sachets en aluminium à 2° - 8°C. Ils sont stables avant ouverture jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le sachet doit être refermé hermétiquement et les tubes doivent être utilisés dans un délai de deux mois, dans la limite de la date de péremption.

Les autres réactifs du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE peuvent être conservés entre 2° et 25°C, et restent stables jusqu'à la date de péremption.

NE PAS CONGELER LES RÉACTIFS.

PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L' ÉCHANTILLON

Le TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE est conçu identifier *S. pneumoniae* isolé à partir d' une culture.

A. **Identification à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des cultures réalisées sur un milieu solide approprié, comme la gélose au sang de mouton à 5%, lorsqu'on observe une morphologie suggestive de *S. pneumoniae*. L'échantillon peut être testé dès que la prolifération est visible et dans les 48h après le début de la culture.

   1. L'échantillon de culture peut être prélevé à l'aide d'une öse en plastique jetable de 1 µl, d'une öse métallique, ou d'une aiguille en plastique jetable. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison de la faible quantité de liquide dans lequel les bactéries vont être remises en suspension.
   2. Il est possible de tester soit plusieurs petites colonies (3 ou 4), soit une seule colonie d'un diamètre d'au moins 1 mm. NE PAS PRELEVER DE COLONIES CONFLUENTES.
   3. Eviter de prélever du milieu de culture avec les bactéries.
   4. Le manipulateur peut à ce stade décider d'ensemencer une autre boîte de Pétri pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.

B. **Identification sur bouillon de culture.** Le test peut être pratiqué à partir de bouillons de culture appropriés, comme le bouillon trypcase - soja ou le bouillon cœur - cervelle, dont la turbidité doit être supérieure ou égale à 1 McFarland. Prélever à la pipette un échantillon de 50 µl de la suspension du bouillon parfaitement homogénéisé, et le verser dans le tube de Réactif Sonde en suivant les instructions du paragraphe PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

Français

MATÉRIEL FOURNI

TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE
bioMérieux réf. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865

	20 Tests
Réactif Sonde (P)	10 x 2 tubes

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Öses de 1 µl en plastique stérile, öses métalliques, aiguilles en plastique ou bâtonnets applicateurs pour prélever les colonies
Souches de contrôle des cultures
Bain-marie ou bloc chauffant * (60° ± 1°C)
Micropipettes (50 µl, 300 µl)
Pipettes répétitives (50 µl, 300 µl)
Vortex

* Les emplacements à l'intérieur du bloc chauffant doivent être adaptés à des tubes de 12 x 75 mm. L'utilisat ion des blocs chauffants GEN-PROBE est recommandée.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE DISTRIBUTEUR GEN-PROBE:

Luminomètre GEN-PROBE LEADER 50i
    (bioMérieux réf. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)
Bloc chauffant (60° ± 1°C)
    (bioMérieux réf. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES AccuProbe
(bioMérieux réf. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)
COFFRET DE REACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE
(bioMérieux réf. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791-1791)

MODE OPERATOIRE

A. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

1. Régler le bain-marie ou le bloc chauffant à 60° ± 1 °C.
2. Préparer le luminomètre GEN-PROBE. S'assurer qu'il y ait suffisamment de Réactifs de Détection I et II pour pratiquer les tests. Dans le cas contraire, remplir les réservoirs du luminomètre selon les instructions du manuel d'utilisation.

B. CONTRÔLES

Des souches de contrôle positif et négatif doivent être testées en routine dans chaque laboratoire selon la réglementation en vigueur. Une culture de *S. pneumoniae* (par ex. American Type Culture Collection, ATCC #33400) peut être utilisée comme contrôle positif et une culture de *Streptococcus bovis* (par ex. ATCC #33317) peut être utilisée comme contrôle négatif.

C. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1. Découper horizontalement la partie supérieure des sachets en aluminium. Retirer le nombre nécessaire de Tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Refermer le sachet hermétiquement en rabattant plusieurs fois son extrémité et en la fixant à l'aide de ruban adhésif ou d'une pince. **Ne pas retirer le sachet dessicant**.
2. Identifier un nombre suffisant de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Oter et conserver les bouchons.
3. Distribuer 50 µl de Réactif 1 (Réactif de Lyse) dans tous les tubes de Réactif Sonde. **Si le test est effectué sur des souches isolées à partir de bouillons de culture, ne pas ajouter de Réactif 1 dans les tubes de Réactif Sonde**.
4. Transférer l'échantillon provenant du milieu solide (une colonie d'au moins 1 mm de diamètre ou plusieurs petites colonies) ou 50 µl du bouillon de culture correctement homogénéisé dans les tubes de Réactif Sonde suivant les instructions du paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Si le test est réalisé à partir d'une culture en milieu solide, agiter l'öse, l'aiguille ou le bâtonnet dans le Réactif 1 (Réactif de Lyse) et mélanger soigneusement pour remettre les microorganismes en suspension.

D. HYBRIDATION

1. Distribuer 50 µl de Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) dans tous les tubes de Réactif Sonde. Reboucher les tubes et les agiter à l'àide d'un manuellement ou à l'aide d'un Vortex.
2. Faire incuber pendant 15 minutes à 60° ± 1°C au bain-marie ou dans le bloc chauffant.

E. SÉLECTION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant. Oter et conserver les bouchons. Distribuer 300 µl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Reboucher les tubes et les agiter à l'àide d'un Vortex pour obtenir un mélange homogène.

2. Faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 5 minutes à 60° ± 1°C à l'àide du bain-marie ou dans le bloc chauffant.

3. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant et les laisser à température ambiante pendant au moins 5 minutes. Oter et jeter les bouchons. **Lire les résultats au luminomètre dans l'heure qui suit**.

F. DÉTECTION

1. Sélectionner le protocole approprié sur le luminomètre.

2. Afin de retirer tout résidu de la surface des tubes, les essuyer à l'aide de papier absorbant humide. Placer ensuite les tubes dans le luminomètre et suivre les instructions.

3. Lorsque l'analyse est terminée, retirer les tubes du luminomètre.

REMARQUES

A. RÉACTIFS: Le Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) peut précipiter à 2° - 8°C. Le chauffer à 35° - 60°C et l'agiter pour dissoudre le précipité.

B. PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLONS: Il est important de prélever les échantillons provenant de culture sur une partie du milieu solide occupée par des colonies isolées.

C. TEMPÉRATURE: La préparation de l'échantillon ainsi que les réactions d'hybridation et de sélection sont thermo-dépendantes. Par conséquent il est impératif que l'incubateur, le bain-marie et le bloc chauffant soient maintenus à la température préconisée.

D. DURÉE DES OPÉRATIONS:

1. La réaction d'hybridation doit être initiée dans les 30 minutes qui suivent l'introduction de l' échantillon et du Réactif 1 dans les tubes de Réactif Sonde.

2. Les réactions d'hybridation et de sélection sont dépendantes du temps. L'hybridation doit durer au moins 15 minutes, mais pas plus de 20 minutes. Pendant l'étape de SELECTION, faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant au moins 5 minutes mais pas plus de 6 minutes.

E. BAIN-MARIE: Le niveau d'eau dans le bain-marie doit être suffisamment élevé pour que la totalité du liquide réactionnel des tubes de Réactif Sonde soit immergée, mais sans que l'eau ne puisse entrer dans les tubes.

F. UTILISATION DU VORTEX: Il est essentiel de disposer d'un mélange homogène durant l'étape SÉLECTION, plus particulièrement après addition du Réactif 3.

G. RESOLUTION D'INCIDENTS:

1. Des valeurs de contrôle négatif élevées (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317), supérieures à 20.000 RLU (Relative Light Units) sur le LEADER ou à 600 PLU (Photometric Light Units) sur l'ACCULDR (anciennement PAL) peuvent être dues soit à une homogénéisation insuffisante après addition du Réactif 3 (Réactif de Sélection), soit à la présence simultanée de plusieurs types de colonies. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.

2. Des valeurs de contrôle positif faibles (*Streptococcus pneumoniae*, ATTCC #33400), inférieures à 50.000 RLU sur le LEADER ou à 1.500 PLU sur l'ACCULDR (anciennement PAL) peuvent être observées lorsque le nombre de germes est insuffisant, lorsque le test est effectué sur des cultures mixtes ou âgées, ou encore lorsque les bactéries ont été laissées dans le Réactif 1 plus

de 30 minutes avant l'addition du Réactif 2. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.

RÉSULTATS

A. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE sont interprétés en fonction d'une valeur seuil. Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieurs à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques, il faut repiquer la souche afin de vérifier sa pureté.

	AccuLDR (anciennement PAL)	**LEADER**
Valeur seuil	1.500 PLU	50.000 RLU
Zone d'Incertitude	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTRÔLE DE QUALITÉ ET ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Les contrôles négatifs (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317) et positifs (*Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	AccuLDR (anciennement PAL)	**LEADER**
Contrôle négatif	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Contrôle positif	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITES DU TEST

Cette méthode a été testée sur des cultures fraîches réalisées sur milieux solides et sur les types de bouillons de culture cités dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Les performances de ce test pratiqué directement sur des échantillons cliniques n'ont pas été évaluées.

Les résultats du TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE doivent être interprétés en fonction des autres données du laboratoire et corrélés avec les données cliniques.

VALEURS ATTENDUES

Le TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE a été comparé aux méthodes classiques de culture avec identification biochimique. Ces méthodes ont été effectuées sur deux sites différents sur un total de 662 souches. Ont été testées: 305 souches de *S. pneumoniae*, 185 souches d'autres espèces de streptocoques et 172 souches issues de 25 genres différents. Une identification par les méthodes traditionnelles a été réalisée (étude de la morphologie des colonies, coloration de Gram, recherche de catalase, analyse de l'activité hémolytique sur milieu gélosé à 5% de sang de mouton, test de sensibilité à l'optochine et solubilité dans la bile). Les souches ont été déterminées soit positives (≥ à 50.0000 RLU), soit négatives (< à 50.000 RLU). Les observations ont montré que les cultures négatives avaient une valeur comprise entre 344 et 32.911 RLU et les cultures positives entre 59.223 et 863.193 RLU. La comparaison de ces résultats avec les méthodes classiques d'identification figure dans le tableau ci-dessous :

AccuProbe / CULTURE

AccuProbe Culture	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	202	0	0	212	100%/100%	100%
Site 2	103	0	0	145	100%/100%	100%
Total	**305**	**0**	**0**	**357**	**100%/100%**	**100%**

Toutes les souches de *S. pneumoniae* ont donné des résultats positifs et toutes les autres souches ont donné des résultats négatifs avec le TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE. La sensibilité, la spécificité et le taux de concordance du test sont de 100%.

PERFORMANCES DU TEST

A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

La précision intra-essai du TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE a été calculée en analysant deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *S. pneumoniae* 10 fois dans une même série.

Échantillon	**A**	**B**
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne(RLU)	101.292	56.025
Ecart-type	4.293	1.743
Coefficient de variation	4,2%	3,1%

B. PRÉCISION INTER-ESSAI

La précision inter-essai a été calculée en analysant en simple deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *S. pneumoniae* au cours de 12 séries distinctes.

Échantillon	**A**	**B**
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	101.322	53.288
Ecart-type	3.660	1.776
Coefficient de variation	3,6%	3,3%

C. SPÉCIFICITÉ

Un total de 95 souches de cultures ATCC a été étudié à l'aide du TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE. Ces souches comprenaient 78 espèces issues de 51 genres différents. Un panel phylogénétique 5 souches de *S. pneumoniae*, 24 souches de 13 autres espèces de streptocoques et 66 souches de 50 autres genres a été testé. Seules les souches de *S. pneumoniae* ont donné un résultat positif avec le TEST AccuProbe D'IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLE D'UNE CULTURE. Les autres micro-organismes ont donné un résultat négatif.

Français

D. TEST DE SURCHARGE

Sept séries de dilutions de *S. pneumoniae* (de 3.000 à 30 millions de microorganismes par dilution) ont été testées en présence de 30 millions de microorganismes appartenant aux espèces non cibles *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus bovis*. Aucune interférence ni réaction croisée n’a été observée.



TEST DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO

(bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865)

UTILIZACION

El TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO es un test de identificación rápida de *Streptococcus pneumoniae (Pneumococcus)* aislado en un cultivo. Este test utiliza la técnica de hibridación de ácidos nucleicos.

RESUMEN Y EXPLICACION DEL TEST

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) es la principal causa de neumonía bacteriana adquirida entre la comunidad en Estados Unidos, donde se producen aproximadamente medio millón de casos por año, con una tasa de complicaciones y de muerte de aproximadamente 5% (2, 4). También es la principal causa de otitis media y de bacteremia en lactantes y niños (2). *S. pneumoniae* es una causa común de meningitis y ha sido aislada en pacientes con conjuntivitis, sinusitis, mastoiditis, pericarditis, bacteremia oculta, artritis y endocarditis (2). Es el tercer cultivo aislado con mayor frecuencia en hemocultivos (6). *S. pneumoniae* puede ser considerado parte de la flora normal de las vías respiratorias superiores; sin embargo, los lactantes, los ancianos y los pacientes debilitados por otras condiciones médicas que comprometen las vías respiratorias o con una función inmunológica disminuida presentan alto riesgo de adquirir una enfermedad neumocócica (2, 3, 4).

La identificación presuntiva se realiza mediante métodos fisiológicos y bioquímicos tradicionales. Estos incluyen morfología de las colonias, tinción de Gram, reacción de la catalasa, actividad alfahemolítica en agar sangre de cordero al 5%, susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis (2). Han sido identificados más de 80 serotipos, en base a los polisacáridos capsulares. Otro medio de identificación es el test de Quellung, en base a la turgencia capsular aparente como respuesta al tratamiento con antisueros de esos polisacáridos. Todos los tests mencionados son subjetivos y ninguno permite la identificación formal de *S. pneumoniae.*

El TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO ofrece un método rápido y no subjetivo para la identificación definitiva de *S. pneumoniae* basado en la detección de secuencias de ARN ribosómico específicas que son exclusivas de *S. pneumoniae*.

PRINCIPIO DE LA TECNICA

Los tests de hibridación de ácido nucleico se basan en la capacidad de cadenas complementarias de ácido nucleico para combinarse específicamente formando complejos bicatenarios estables (5). El SISTEMA AccuProbe utiliza una sonda de ADN monocatenaria marcada con quimioluminiscencia, complementaria del ARN ribosómico del organismo diana. Después que el ARN ribosómico ha sido liberado del organismo, la sonda de ADN marcado se combina con el ARN ribosómico del organismo diana para formar un híbrido ADN:ARN estable. El Reactivo de Selección permite diferenciar las sondas hibridadas de las no hibridadas.

Español

Los híbridos ADN:ARN marcados son medidos en el luminómetro GEN-PROBE. Un resultado positivo es una lectura en el luminómetro igual o superior al umbral. Un valor por debajo del umbral es un resultado negativo.

REACTIVOS

Los reactivos para el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO son suministrados en tres kits de reactivos diferentes:

KIT AccuProbe CON SONDA PARA STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Reactivo Sonda (P) (10 x 2 tubos)
Streptococcus pneumoniae.

KIT AccuProbe DE REACTIVO DE IDENTIFICACION

Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) (1) 1 x 10 ml
Solución tamponada que contiene 0,04% de azida sódica.

Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) (2) 1 x 10 ml
Solución tamponada.

Reactivo 3 (Reactivo de Selección) (3) 1 x 60 ml
Solución tamponada.

KIT GEN-PROBE DE REACTIVO DE DETECCION

Reactivo de Detección I (RI) 1 x 240 ml
Peróxido de hidrógeno al 0,1% en ácido nítrico 0,001 N.

Reactivo de Detección II (RII) 1 x 240 ml
Hidróxido de sodio 1 N.

PRECAUCIONES DE EMPLEO

A. Sólo para diagnóstico *in vitro*.

B. Utilizar las precauciones habituales al realizar este ensayo (1).

C. Utilizar sólo para la identificación de *Streptococcus pneumoniae* aislado en cultivo.

D. Utilizar sólo el material de laboratorio suministrado o el material desechable especificado.

E. Los reactivos de este kit contienen azida sódica que pueden reaccionar con las tuberias de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Al eliminar estos reactivos, diluir el material con un gran volumen de agua para prevenir la acumulación de azidas en las tuberias.

F. Evitar el contacto de los Reactivos de Detección I y II con la piel y las mucosas. Lavar con agua si estos reactivos entran en contacto con la piel. Si se producen derrames de estos reactivos, diluir con agua antes de secar.

CONSERVACION

Los tubos de Reactivo Sonda pueden ser conservados en bolsas de aluminio entre 2° y 8°C. Los tubos de Reactivo Sonda son estables en las bolsas sin abrir hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abiertas, las bolsas deben ser cerradas nuevamente y los tubos deben ser utilizados dentro de los dos meses siguientes y antes de la fecha de caducidad.

Otros reactivos utilizados en el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO pueden ser conservados entre 2° y 25°C y son estables hasta la fecha de caducidad indicada.

NO CONGELAR LOS REACTIVOS.

TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

El TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO está diseñado para identificar *S. pneumoniae* aislado en cultivo.

A. **Identificación a partir de un cultivo en medio sólido.** Puede analizarse un cultivo en un medio sólido adecuado tal como agar sangre de cordero al 5% con una morfología que sugiera la presencia de *S. pneumoniae*. Las muestras pueden ser analizadas apenas sea visible el crecimiento, pero antes de 48 horas.

   1. La muestra puede ser tomada con un asa de plástico desechable de 1 µl, un asa metálica, una aguja de plástico desechable o un bastoncillo. No deben usarse torundas dado el escaso volumen de líquido en el cual serán vueltas a suspender las células.
   2. Si se analiza una sola colonia, debe tener por lo menos 1 mm de diámetro. También pueden analizarse varias (3 a 4) colonias más pequeñas. NO USAR COLONIAS CONFLUENTES.
   3. Evitar tomar medio de cultivo junto con las células.
   4. El usuario puede elegir inocular otra placa de cultivo en este momento con el fin de confirmar la pureza de la colonia.

B. **Identificación en caldo de cultivo**. Pueden ser analizados caldos de cultivo apropiados tales como tripcase soja o infusión de caldo cerebro/corazón con turbidez equivalente o igual a 1 McFarland. Pueden utilizarse cultivos en caldo, incubados hasta 24 horas a 37°C. Pipetear una muestra de 50 µl de una suspensión de caldo bien homogeneizada dentro de los tubos de Reactivo Sonda, como se describe a continuación.

MATERIALES SUMINISTRADOS

TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO
bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865

	20 Tests
Reactivo Sonda (P)	10 x 2 tubos

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Asas de inoculación de plástico estéril de 1 µl, asas metálicas, agujas de plástico o bastoncillo para seleccionar las colonias
Cepas de cultivo de control
Baño maría o bloque calefactor * (60° ± 1°C)
Micropipetas (50 µl, 300 µl)
Pipeta de repetición (50 µl, 300 µl)
Vortex

* Los emplazamientos del bloque calefactor deben tener pocillos del tamaño adecuado para los tubos de 12 x 75 mm. Se recomienda utilizar bloques calefactores GEN-PROBE.

DISPONIBLE EN SU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)
Bloque calefactor (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

KIT AccuProbe DE REACTIVO DE IDENTIFICACION DE CULTIVO
(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)
KIT GEN-PROBE DE REACTIVO DE DETECCION
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791-1791)

TECNICA

A. PREPARACION DEL EQUIPO

1. Ajustar el baño maría o el bloque calefactor a 60° ± 1°C.

2. Preparar el luminómetro GEN-PROBE para su utilización. Verificar que se cuenta con un volumen suficiente de Reactivos de _Detección I y II para completar los tests. Si no hay suficiente reactivo en los depósitos, llenar los depósitos siguiendo las instrucciones del Manual de Empleo.

B. CONTROLES

Las cepas de control positivo y negativo pueden ser analizadas en forma rutinaria en cada laboratorio, conforme a la reglamentación en vigor. Un cultivo de *S. pneumoniae* (p. ej., American Type Culture Collection, ATCC #33400) puede ser utilizado como control positivo, mientras que un cultivo de *Streptococcus bovis* (p. ej., ATCC #33317) puede ser utilizado como control negativo.

C. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

1. Abrir la bolsa de aluminio cortando su parte superior. Sacar una cantidad suficiente de tubos de Reactivo Prueba para analizar los cultivos aislados y/o los controles. Volver a cerrar la bolsa doblando varias veces su extremo abierto y fijar con cinta adhesiva o con una pinza. **Dejar la bolsa desecante dentro de la bolsa.**

2. Colocar una etiqueta en una cantidad suficiente de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras aisladas y/o los controles. Retirar y conservar los tapones.

3. Pipetear 50 µl de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) en todos los tubos de Reactivo Sonda. **Si se estudian cultivos en caldo, no añadir Reactivo 1 a los tubos de Reactivo Sonda.**

4. Transferir una colonia de 1 mm o varias colonias pequeñas de un medio sólido o 50 µl de un cultivo en caldo bien homogeneizado en los tubos de Reactivo Sonda, como se describe en la sección TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. Agitar el asa, aguja o bastoncillo en el Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) para suspender las células si se analizan colonias de un medio sólido, y mezclar cuidadosamente.

D. HIBRIDACION

1. Pipetear 50 µl de Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) en todos los tubos de Reactivo Sonda. Volver a tapar los tubos de Reactivo Sonda y agitar sacudiéndolos o mezclándolos en un VORTEX.

2. Incubar durante 15 minutos a 60° ± 1°C en un baño maría o bloque calefactor.

E. SELECCION

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o bloque calefactor. Retirar y conservar los tapones. Pipetear 300 µl del Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo. Volver a tapar los tubos y mezclarlos en VORTEX para homogeneizarlos.

2. Incubar los tubos de Reactivo Sonda durante 5 minutos a 60° ± 1°C en baño maría o bloque calefactor.

3. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o bloque calefactor y dejarlos a temperatura ambiente por lo menos durante 5 minutos. Retirar y descartar los tapones. **Leer los resultados en el luminómetro en la hora siguiente a la extracción de los tubos del baño maría o del bloque calefactor.**

F. DETECCION

1. Seleccionar el protocolo adecuado en el menú del software del luminómetro.
2. Utilizando un trapo húmedo o una toalla de papel, limpiar cada tubo para asegurar que no se encuentran residuos en la parte externa del tubo e insertar el tubo en el luminómetro, siguiendo las indicaciones adjuntas al instrumento.
3. Una vez completado el análisis, retirar el o los tubos del luminómetro.

OBSERVACIONES

A. REACTIVOS: El Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) puede precipitar entre 2° y 8°C. Calentar y agitar la solución entre 35° y 60°C para disolver el precipitado.

B. TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS: Es importante que la muestra proceda de un cultivo en medio sólido donde se presenten colonias aisladas.

C. TEMPERATURA: Las reacciones de preparación de la muestra, hibridación y selección son termodependientes. Es imperativo por lo tanto que el incubador, baño maría o bloque calefactor se mantengan dentro de los límites de temperatura especificados.

D. TIEMPO:

1. La reacción de hibridación debe iniciarse en los 30 minutos siguientes a la incorporación de la muestra y del Reactivo 1 a los tubos de Reactivo Sonda.
2. Las reacciones de hibridación y selección son cronodependientes. Hibridar por lo menos 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Incubar los tubos de Reactivo Sonda durante la etapa de SELECCIÓN por lo menos durante 5 minutos, pero no más de 6 minutos.

E. BAÑO MARIA: El nivel de agua en el baño maría debe mantenerse para garantizar que todo el volumen del líquido de reacción de los tubos de Reactivo Sonda se encuentre sumergido, pero no debe ser tan alto como para que el agua penetre en los tubos.

F. VORTEX: Es crítico contar con una mezcla homogénea durante la etapa de SELECCIÓN, en particular después de añadir el Reactivo 3.

G. RESOLUCION DE INCIDENTES:

1. Valores elevados de control negativo (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317), superiores a 20.000 RLU (Relative Light Units - Unidades de Luz Relativas) en el LEADER o a 600 PLU (Photometric Light Units - Unidades Fotométricas de Luz) en el AccuLDR (antes PAL) pueden ser provocados por una homogeneización insuficiente después de incorporar el Reactivo 3 (Reactivo de Selección) o bien si se analizan cultivos mixtos. Para verificar si se trata de un cultivo mixto, se puede repicar una parte sobre un medio sólido apropiado e incubar.
2. Valores bajos de control positivo (*Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400), inferiores a 50.000 RLU o 1.500 PLU en el AccuLDR (antes PAL) pueden ser causados por un número insuficiente de células, por analizar cultivos mixtos o envejecidos o por dejar las células en el Reactivo 1 más de 30 minutos después de la incorporación del Reactivo 2. Para verificar si se trata de un cultivo mixto, se puede repicar una parte sobre un medio sólido apropiado e incubar.

RESULTADOS

A. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados del TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO se basan en los valores umbral que siguen. Las muestras que producen señales iguales o superiores a estos valores umbral son consideradas positivas. Las señales inferiores a estos valores umbral son consideradas negativas. Los resultados en la zona de incertidumbre deben ser repetidos. Si el segundo análisis da resultados dudosos, se debe repicar la cepa con el fin de verificar su pureza.

	AccuLDR (antes PAL)	**LEADER**
Valor umbral	1.500 PLU	50.000 RLU
Zona de incertidumbre	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

El control negativo (p. ej., *Streptococcus bovis*, ATCC #33317) y el control positivo (p. ej., *Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400) deben satisfacer los siguientes valores:

	AccuLDR (antes PAL)	**LEADER**
Control negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Control positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITES DEL METODO

Este método ha sido analizado utilizando cultivos frescos usando los medios sólidos y los caldos de cultivo citados en la sección TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. La eficacia del test no ha sido demostrada en muestras clínicas directas.

Los resultados del TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO deben ser interpretados conjuntamente con otros datos de laboratorio y clínicos disponibles para el clínico.

VALORES ESPERADOS

El TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO fue comparado con métodos de identificación bioquímicos standard en dos sitios, utilizando un total de 662 muestras clínicas. De éstas 305 fueron cepas de *S. pneumoniae,* 185 fueron cepas de otras especies de *Streptococcus* y 172 fueron otras cepas microbianas, que representaban a 25 géneros. Los métodos de identificación standard incluyeron tinción de Gram, morfología de las colonias, reacción de la catalasa, actividad hemolítica en agar sangre de cordero al 5%, susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis. Las cepas fueron catalogados ya sea como positivos (≥ 50.000 RLU) o negativos (< 50.000 RLU). Las observaciones demostraron que para los cultivos negativos se obtenían valores de 344 a 32.911 RLU y 59.223 a 863.193 RLU para los cultivos positivos. Una comparación entre el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO y los métodos standard de identificación de cultivos se presenta a continuación.

AccuProbe / IDENTIFICACION DE CULTIVO

AccuProbe Cultivo	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidad/ Especificidad	Porcent. Concordancia
Sitio 1	202	0	0	212	100%/100%	100%
Sitio 2	103	0	0	145	100%/100%	100%
Total	**305**	**0**	**0**	**357**	**100%/100%**	**100%**

Todos las cepas de *S. pneumoniae* dieron un resultado positivo y todas los otras cepas clínicas, que representaban un corte filogenético de organismos, dieron un resultado negativo con el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO. El porcentaje de sensibilidad, el porcentaje de especificidad y el porcentaje de concordancia del TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO, comparado con otros métodos standard de identificación de cultivos, es de 100%.

RESULTADOS ESPERADOS

A. PRECISION INTRA-ENSAYO

La precisión intra-ensayo para el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO fue calculada analizando dos concentraciones de ARN ribosómico aislado de *S. pneumoniae* y utilizando 10 replicaciones en un mismo ensayo.

Muestra	A	B
Número de replicaciones	10	10
Respuesta media	101.292	56.025
Desviación típica	4.293	1.743
Coeficiente de variación	4,2%	3,1%

B. PRECISION INTER-ENSAYO

La precisión inter-ensayo fue calculada analizando las mismas dos concentraciones de ARN ribosómico de *S. pneumoniae,* utilizando determinaciones únicas en 12 series consecutivas.

Muestra	A	B
Número de replicaciones	12	12
Respuesta media	101.322	53.288
Desviación tipo	3.660	1.776
Coeficiente de variación	3,6%	3,3%

C. ESPECIFICIDAD

Un total de 95 cepas de referencia ATCC fueron evaluadas utilizando el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO. Estas cepas representaban un total de 78 especies de 51 géneros. Cinco cepas de *S. pneumoniae*, 24 cepas de otras 12 especies de *Streptococcus* y 66 cepas de otros 50 géneros que representaban un corte filogenético de organismos fueron evaluados utilizando el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO. Todos las muestras analizadas de *S. pneumoniae* dieron resultados positivos utilizando el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO. Otras especies de *Streptococcus* y el corte filogenético de especies no reaccionaron con este kit.

D. TEST DE SOBRECARGA

Siete diluciones en serie de células de *S. pneumoniae* entre 3 mil y 30 millones de células por ensayo fueron analizadas en presencia de 30 millones de células de las siguientes especies no diana: *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus bovis*. La presencia de las especies no diana no interfirió con la señal positiva de las diluciones de células de *S. pneumoniae* ni generó una reacción positiva con el TEST AccuProbe DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AISLADO EN CULTIVO.

GEN-PROBE

AccuProbe

TEST DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA

(bioMérieux cod. 39204 / Gen-Probe Cat. N. 102865/2865)

IMPIEGO

Il TEST AccuProbe PER L' IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA è un test che consente l' identificazione rapida- mediante sonda a DNA - dello *S. pneumoniae (Pneumococcus)* isolato a partire da una coltura. Questo test impiega la tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

INTRODUZIONE

Lo *Streptococcus pneumoniae (S. pneumoniae)* è il principale responsabile, negli Stati Uniti, delle pneumopatie batteriche di comunità. Ogni anno vengono registrati all'incirca 500.000 casi, nel 5% dei quali possono insorgere complicanze anche mortali (2, 4). Lo *S. pneumoniae* è all'origine inoltre della maggior parte delle otiti e delle batteriemie nei neonati e nei bambini (2). È' spesso responsabile di meningiti ed è stato isolato in soggetti colpiti da congiuntiviti, sinusiti, mastoiditi, pericarditi, batteriemie latenti, artriti ed endocarditi (2). Si trova al terzo posto fra i germi isolati tramite emocoltura (6). Sebbene lo *S. pneumoniae* possa essere ritenuto un ospite commensale delle vie respiratorie superiori nel soggetto sano, i neonati, le persone anziane e i pazienti indeboliti da altre affezioni respiratorie o immunodepressi costituiscono un terreno estremamente favorevole per lo sviluppo di un'infezione pneumococcica (2, 3, 4).

Le metodiche tradizionali fisiologiche e biochimiche consentono di effettuare identificazioni per via presuntiva. Fra queste metodiche annoveriamo lo studio morfologico della colonia, l'esame dopo colorazione di Gram, la ricerca di catalasi, l'analisi dell'attività α–emolitica su agar-sangue di montone al 5%, lo studio della sensibilità all'optochina e della solubilità nella bile (2). Lo studio dei polisaccaridi capsulari ha consentito di individuare oltre 80 sierotipi. Il test del Quellung è un'altra possibile metodica di identificazione; si basa sull'osservazione del rigonfiamento capsulare prodotto come risposta al trattamento mediante antisiero. Comunque, tutti i test citati sono soggettivi e nessuno di essi permette un'identificazione formale dello*S. pneumoniae.*

Il TEST AccuProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA è un test rapido ed obiettivo e permette l'identificazione dello*S. pneumoniae* grazie alla rilevazione di specifiche sequenze di RNA ribosomiale.

PRINCIPIO OPERATIVO

I test di ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti complementari di acidi nucleici di accoppiarsi in maniera specifica per formare composti stabili a doppia catena (5). Il test AccuProbe impiega una sonda a DNA a catena singola - associata ad un marker chemioluminiscente - complementare all'RNA ribosomiale (rRNA) dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sue sequenze omologhe formando un complesso DNA-RNA stabile. Il Reagente di

Italiano

Selezione consente di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il luminometro GEN-PROBE permette di misurare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro indicherà un valore superiore o uguale al valore soglia; negativo se mostrerà un valore inferiore.

REAGENTI

I reagenti impiegati nel TEST AccuProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA sono forniti in tre diversi kit:

KIT SONDA PER STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ACCUPROBE

Reagente Sonda (P) (10 x 2 provette)
Streptococcus pneumoniae.

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURA ACCUPROBE

Reagente 1 (Reagente di Lisi) (1) 1 x 10 ml
Soluzione tamponata contenente 0,04% di sodio azide.

Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) (2) 1 x 10 ml
Soluzione tamponata.

Reagente 3 (Reagente di Selezione) (3) 1 x 60 ml
Soluzione tamponata.

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE

Reagente di Rivelazione I (RI) 1 x 240 ml
0,1% di acqua ossigenata in acido nitrico 0,001 N.

Reagente di Rivelazione II (RII) 1 x 240 ml
Idrossido di sodio 1 N.

PRECAUZIONI D'USO

A. Il test è riservato esclusivamente ad un uso diagnostico *in vitro.*

B. Durante la l'esecuzione di questo test adottare le normali precauzioni (1).

C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione dello*S. pneumoniae* isolato a partire da una coltura.

D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso.

E. I reagenti di questo kit contengono sodio azide, una sostanza che può reagire con il piombo o il rame delle condutture e formare composti metallici esplosivi. Durante l'eliminazione di questi reagenti, ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti nelle tubature.

F. Evitare qualsiasi contatto della cute e delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II. In caso di contatto, sciacquare accuratamente con acqua le parti interessate. Se si verificassero versamenti di reagenti, diluirli con acqua prima di asciugare la superficie.

CONSERVAZIONE

Le provette di Reagente Sonda devono essere conservate in confezioni di alluminio a temperature comprese fra 2° e 8°C. Prima dell'apertura rimangono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, la confezione deve essere richiusa ermeticamente e le provette devono essere usate nell'arco di due mesi, entro e non oltre la data di scadenza.

Gli altri reagenti del TEST AccuProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

NON CONGELARE I REAGENTI.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il TEST AccuProbe per l' IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA è stato progettato per identificare lo*S. pneumoniae* isolato a partire da una coltura.

A. **Identificazione a partire da coltura solida.** Il test può essere condotto su un adeguato terreno solido, come un terreno di coltura agar-sangue di montone al 5% quando si osserva una morfologia che può far pensare allo *S. pneumoniae*. Il campione può esser testato sin da quando sono visibili le colonie e nelle 48 ore successive.

   1. Il campione può essere prelevato mediante un'ansa di plastica monouso da 1 µl, un'ansa metallica o un ago in plastica monouso. Data la bassa quantità di liquido in cui i batteri verranno rimessi in sospensione si consiglia di non usare tamponi.
   2. È possibile testare più colonie piccole (3 o 4) oppure una sola colonia il cui diametro sia almeno di 1 mm. NON PRELEVARE COLONIE CONFLUENTI.
   3. Non effettuare prelievi dal mezzo di coltura con i batteri.
   4. A questo punto la persona addetta può decidere di inoculare un'altra piastra di Petri per confermare la purezza del campione isolato.

B. **Identificazione su brodo di coltura.** Il test può essere condotto su adeguati brodi di coltura, come il brodo tripticase-soia o il brodo cuore-cervello la cui torbidità deve essere superiore o uguale a 1 McFarland. Prelevare con la pipetta un campione da 50 µl della sospensione del brodo perfettamente omogeneizzato e dispensarlo nella provetta di Reagente Sonda attenendosi alle istruzioni del paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

MATERIALE COMPRESO NEL KIT

TEST AccuProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA
bioMérieux cod. 39204 / Gen-Probe Cat. N. 102865/2865

	20 Test
Reagente Sonda (P)	10 x 2 provette

MATERIALE RICHIESTO NON COMPRESO NEL KIT

Anse da 1 µl in plastica sterile, anse metalliche, aghi in plastica o bacchette per applicazione allo scopo di prelevare le colonie
Ceppi di controllo delle colture
Bagnomaria o incubatore* (60° ± 1°C)
Micropipette(50 µl, 300 µl)
Micropipette a volume fisso (50 µl, 300 µl)
Vortex

* Gli alloggiamenti all'interno dell'incubatore devono essere perfettamente dimensionati per provette da 12 x 75 mm. Si raccomanda l'impiego di incubatori GEN-PROBE.

Italiano

ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE GEN-PROBE

Luminometro GEN-PROBE LEADER 50i
(bioMérieux cod. 39400 / Gen-Probe Cat. N. 103100i/3100i)
Incubatore (60° ± 1°C))
(bioMérieux cod. 39406 / Gen-Probe Cat. N. 3397)
KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURE AccuProbe
(bioMérieux cod. 39305 / Gen-Probe Cat. N. 102800/2800)
KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE
(bioMérieux cod. 39300 / Gen-Probe Cat. N. 201791-1791)

PROCEDIMENTO

A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE

1. Impostare l'incubatore o il bagnomaria a 60° ± 1°C.
2. Preparare il luminometro GEN-PROBE. Assicurarsi che la quantità di Reagenti di Rivelazione I e II si sufficiente per condurre i test. Se non fosse così, riempire il serbatoio del luminometro attenendosi alle istruzioni contenute nel manuale d'uso.

B. CONTROLLI

In ogni laboratorio occorrerà testare sistematicamente ceppi come controllo positivo e negativo, secondo le normative in vigore. È possibile usare una coltura di *S. pneumoniae* (ad es. American Type Culture Collection, ATCC #33400) come controllo positivo ed una coltura di *Streptococcus bovis* (ad es. ATCC #33317) come controllo negativo.

C. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Tagliare orizzontalmente la parte superiore delle confezioni di alluminio. Prelevare il numero necessario di Provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Richiudere ermeticamente la confezione ripiegando più volte l'estremità e fermandola con nastro adesivo o con una clip. **Non asportare la confezione di agenti essiccanti.**
2. Predisporre un numero sufficiente di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o i ceppi di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
3. Dispensare 50 µl di Reagente 1 (Reagente di Lisi) in ogni provetta di Reagente Sonda. **Se il test viene condotto su ceppi isolati a partire da brodi di coltura, non aggiungere Reagente 1 nelle provette del Reagente Sonda.**
4. Trasportare il campione proveniente dal terreno di coltura solido (una colonia di almeno 1 mm di diametro o più colonie piccole) o 50 µl del brodo di coltura correttamente omogeneizzato nelle provette di Reagente Sonda attenendosi alle istruzioni fornite nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Se il test viene eseguito su una coltura solido, vortexare l'ansa, l'ago o la bacchetta nel Reagente 1 (Reagente di Lisi) e mescolare con cura per rimettere i microrganismi in sospensione.

D. IBRIDAZIONE

1. Dispensare 50 µl di Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) in ogni provetta di Reagente Sonda. Richiudere le provette e agitarle mediante Vortex oppure agitarle manualmente.
2. Mettere in incubazione per 15 minuti a 60° ± 1°C in un bagnomaria o in incubatore.

E. SELEZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 300 μl di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette e agitarle mediante Vortex per rendere omogenea la miscela.
2. Mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione per 5 minuti a 60° ± 1°C a bagnomaria o in incubatore.
3. Rimuovere le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e lasciarle a temperatura ambiente almeno per 5 minuti. Togliere e gettare i tappi. **Leggere i risultati sul luminometro nell'ora successiva.**

F. LETTURA

1. Selezionare il protocollo giusto sul luminometro.
2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugare utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire successivamente le provette nel luminometro e seguire attentamente le istruzioni.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.

OSSERVAZIONI

A. REAGENTI: Il Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) può precipitare. Riscaldare a 35° e 60°C e agitarlo mediante Vortex per sciogliere il precipitato.

B. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE: è necessario prelevare i campioni provenienti dalla coltura su una parte del terreno solido occupata da colonie isolate.

C. TEMPERATURA: la preparazione del campione così come l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza, è indispensabile mantenere il bagnomaria o l'incubatore alla temperatura raccomandata.

D. DURATA DELLE OPERAZIONI:

1. La reazione di ibridazione deve essere iniziata nei 30 minuti successivi all'introduzione del campione e del Reagente 1 nelle provette del Reagente Sonda.
2. Le reazioni di ibridazione e di selezione dipendono dal tempo. L'Ibridazione deve durare come minimo 15 minuti, ma non oltre 20 minuti. Durante la SELEZIONE, mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione almeno per 5 minuti, senza superare però il limite dei 6 minuti.

E. BAGNOMARIA: il livello d'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente sommersa, evitando comunque la penetrazione dell'acqua nelle provette.

F. USO DEL VORTEX: è fondamentale disporre di una miscela omogenea durante la fase di SELEZIONE, in particolare dopo l'aggiunta del Reagente 3.

G. SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI:

1. Alti valori di controllo negativo (*Streptococcus bovis,* ATCC #33317) superiori a 20.000 RLU (Relative Light Units) su luminometro LEADER o a 600 PLU (Photometric Light Units) sul luminometro ACCULDR (precedentemente PAL) possono essere riscontrati quando l'omogeneizzazione è stata insufficiente dopo l'inoculazione del Reagente 3 (Reagente di

Selezione) o quando siamo in presenza di vari tipi di colonie. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare.

2. Bassi valori di controllo positivo *(Streptococcus pneumoniae,* ATCC #33400) inferiori a 50.000 RLU sul luminometro LEADER o a 1.500 PLU sul luminometro AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere rilevati quando il numero di germi è insufficiente o quando il test viene effettuato su colture miste o invecchiate o quando i batteri siano stati lasciati nel Reagente 1 per oltre 30 minuti prima di aggiungere il Reagente 2. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare.

RISULTATI DEL TEST

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del TEST AccuProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA vengono interpretati in base ad un valore soglia. I campioni che originano un segnale superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si posiziona nell'area di incertezza, il test deve essere ripetuto. Se la seconda analisi fa nuovamente emergere risultati equivoci, occorre trapiantare il ceppo per verificarne la purezza.

	AccuLDR (precedentemente PAL)	**LEADER**
Valore soglia	1.500 PLU	50.000 RLU
Area di incertezza	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROLLO DI QUALITÀ ED ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad es. *Streptococcus bovis,* ATCC #33317) e positivi (*Streptococcus pneumoniae,* ATCC #33400) devono soddisfare i seguenti valori:

	AccuLDR (precedentemente PAL)	**LEADER**
Controllo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controllo positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITI DEL TEST

Questo metodo è stato tentato su colture fresche realizzate in terreni di coltura solidi e sui tipi di brodo di coltura menzionati nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Le performance di questo test eseguito direttamente su campioni clinici non sono state valutate.

I risultati del TEST AccuProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA devono essere interpretati in base ad altri dati di laboratorio e correlati ai dati clinici.

VALORI ATTESI

Il TEST AccuProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA è stato confrontato con le metodiche tradizionali di coltura di identificazione biochimica. Queste metodiche sono state applicate su due diversi centri per un totale di 662 ceppi. Sono stati testati: 305 ceppi di *S. pneumoniae,* 185 ceppi di altre specie di streptococchi e 172 ceppi provenienti da 25 generi diversi. È stata eseguita un'identificazione tramite le metodiche tradizionali (studio della morfologia delle colonie, colorazione di Gram, ricerca di catalasi, analisi dell'attività emolitica su terreno agar-sangue di montone al

5%, test di sensibilità all'optochina e solubilità nella bile). I campioni sono stati dichiarati positivi (≥ 50.000 RLU) ovvero negativi (< 50.000 RLU). I risultati osservati andavano da 344 a 32.911 RLU per le colture negative e da 59.223 a 863.193 RLU per le colture positive. Il raffronto di questo risultato con le metodiche tradizionali di identificazione è di seguito indicato:

ACCUPROBE / COLTURA D'IDENTIFICAZIONE

ACCUPROBE	**Pos**	**Pos**	**Neg**	**Neg**	**Sensibilità/**	**Tasso di**
Coltura	**Pos**	**Neg**	**Pos**	**Neg**	**Specificità**	**concordanza**
Centro 1	202	0	0	212	100%/100%	100%
Centro 2	103	0	0	145	100%/100%	100%
Totale	**305**	**0**	**0**	**357**	**100%/100%**	**100%**

Tutti i ceppi di *S. pneumoniae* hanno evidenziato risultati positivi e tutti gli altri ceppi hanno mostrato risultati negativi con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA. La sensibilità, la specificità ed il tasso di concordanza del test sono del 100%.

PERFORMANCE DEL TEST

A. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA è stata calcolata analizzando tre diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *S. pneumoniae* per 10 volte in una medesima serie.

Campione	**A**	**B**
Numero di test	10	10
Risposta media	101.292	56.025
Deviazione standard	4.293	1.743
Coefficiente di variazione	4,2%	3,1%

B. PRECISIONE TRA-TEST

La precisione tra-test è stata calcolata analizzando con la modalità della determinazione unica le stesse tre concentrazioni di RNA ribosomiale di *S. pneumoniae* in 12 serie differenti.

Campione	**A**	**B**
Numero di test	12	12
Risposta media	101.322	53.288
Deviazione standard	3.660	1.776
Coefficiente di variazione	3,6%	3,3%

C. SPECIFICITÀ

È stato studiato un totale di 95 ceppi ATCC tramite il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA. Questi ceppi rappresentavano un totale di 78 specie provenienti da 51 generi diversi. È stato testato un panello filogenetico di 5 ceppi di *S. pneumoniae,* 24 ceppi di altre 13 specie di streptococchi e 66 ceppi di altri 50 generi. Unicamente i ceppi di *S. pneumoniae* hanno mostrato risultati postivi con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATO DA UNA COLTURA. Gli altri microrganismi hanno evidenziato un risultato negativo.

D. TEST DI SOVRACCARICO

Sette serie di diluizioni di *S. pneumoniae* (da 3.000 a 30 milioni di microrganismi per diluizione) sono state analizzate in presenza di 30 milioni di microrganismi di specie diverse, vale a dire: *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus bovis.* Non è stata rilevata alcuna interferenza né reazione incrociata.



STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

(bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865)

UTILIZAÇÃO

O AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um teste de identificação rápida por sonda ADN de *S. pneumoniae (Pneumococcus)* isolados de uma cultura. Este teste utiliza a técnica de hibridização dos ácidos nucleicos.

INTRODUÇÃO

Nos Estados-Unidos, o *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae)* é o principal responsável pelas pneumopatias bacterianas comunitárias, com aproximadamente meio milhão de casos por ano e em 5% desses casos surgem complicações e morte (2, 4). É igualmente a causa da maior parte das otites e das bacteriémias no recém-nascido e na criança (2). O *S. pneumoniae* é frequentemente responsável pelas meningites e foi isolado nos pacientes com conjuntivite, sinusite, mastoidite, pericardite, bacteriémia latente, artrite e endocardite (2). É o terceiro germe isolado em hemoculturas (6). Mesmo podendo o *S. pneumoniae* ser considerado como um comensal das vias aéreas superiores num sujeito são, os recém-nascidos, os idosos e os pacientes fragilizados por outras infecções respiratórias, ou imuno-deprimidos, representam um terreno particularmente favorável ao desenvolvimento de uma infecção pneumocócica (2, 3, 4).

Os métodos tradicionais fisiológicos e bioquímicos permitem fazer identificações presuntivas. Estes incluem o estudo morfológico da colónia, o exame após coloração de Gram, a pesquisa de catalase, a análise da actividade α-hemolítica em gelose com 5% de sangue de carneiro, o estudo da sensibilidade à optoquina e da solubilidade na bílis (2). O estudo dos polissacarídios capsulares permitiu identificar mais de 80 serotipos. O teste de Quellung é outro método de identificação possível; baseia-se na observação do enchimento capsular aparente em resposta ao tratamento por um antisoro. No entanto, todos os testes aqui mencionados são subjectivos, e nenhum deles permite uma identificação inequívoca de *S. pneumoniae.*

O AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um teste rápido e objectivo que permite a identificação definitiva de *S. pneumoniae*, pela detecção de sequências de ARN ribossómico que lhe são específicas.

PRINCÍPIO

Os testes por hibridização de ácidos nucleicos baseiam-se na capacidade de cadeias complementares de ácidos nucleicos emparelharem de forma específica para formar complexos bicatenários estáveis (5). O método AccuProbe utiliza uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimioluminescente complementar de ARN ribossómico (ARNr) do organismo alvo. Quando o ARN do organismo alvo é libertado, a sonda hibridiza com este para formar um complexo ADN - ARN estável. O Reagente de Selecção permite diferenciar as sondas hibridizadas das não-hibridizadas. O luminómetro

GEN-PROBE mede o sinal luminoso emitido pelos híbridos ADN-ARN. O resultado é positivo se o luminómetro indicar um valor superior ou igual ao valor limiar, é negativo se indicar um valor inferior.

REAGENTES

Os reagentes utilizados para o ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são fornecidos em três embalagens distintas:

ACCUPROBE SONDA PARA STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Reagente Sonda (P) *Streptococcus pneumoniae.*	(10 x 2 tubos)

ACCUPROBE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

Reagente 1 (Reagente de Lise) (1) Solução tampão contendo 0,04% de azida sódica.	1 x 10 ml
Reagente 2 (Reagente de Hibridização) (2) Solução tampão.	1 x 10 ml
Reagente 3 (Reagente de Selecção) (3) Solução tampão.	1 x 60 ml

REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE

Reagente de Detecção I (RI) 1% peróxido de hidrogéneo em 0,001 N ácido nítrico.	1 x 240 ml
Reagente de Detecção II (RII) 1 N hidróxido de sódio.	1 x 240 ml

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

A. Unicamente para diagnóstico *in vitro*.

B. Usar as precauções habituais quando efectuar este teste (1).

C. Utilizar unicamente para a identificação de *S. pneumoniae* isoladas de uma cultura.

D. Utilizar unicamente o material fornecido ou material de utilização única.

E. Os reagentes desta embalagem contêm azida sódica susceptível de reagir com as canalizações de chumbo ou de cobre formando azidas metálicas explosivas. Quando eliminar estes reagentes, é aconselhável diluir com bastante água para prevenir a formação de azidas na canalização.

F. Evitar o contacto dos Reagentes de Detecção I e II com a pele, os olhos e com as mucosas. No caso de contacto, lavar com água. Se estes reagentes forem derramados, diluí-los com água antes de limpar.

CONSERVAÇÃO

Os tubos de Reagente Sonda devem ser conservados nas saquetas/sachets de alumínio a 2° - 8° C. Antes da abertura, permanecem estáveis até à data de validade indicada. Depois da abertura, a saqueta/sachet deve ser bem fechada e os tubos devem ser utilizados num prazo de dois meses, dentro do prazo de validade.

Os outros reagentes do ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA podem ser conservados entre 2° e 25°C, e permanecem estáveis até à data de validade.

NÃO CONGELAR OS REAGENTES.

COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi concebido para identificar *S. pneumoniae* isolado de uma cultura.

A. **Identificação a partir de cultura em meio sólido.** O teste pode ser efectuado em culturas realizadas num meio sólido apropriado, por exemplo, gelose com 5% sangue de carneiro, quando se observar uma morfologia que sugere *S. pneumoniae*. A amostra pode ser analisada logo que a proliferação seja visível e durante 48h.

   1. A amostra de cultura pode ser colhida/coletada com uma ansa de plástico descartável de 1 µl, com uma ansa metálica ou com uma agulha de plástico descartável. Não utilizar zaragatoas/swabs uma vez que as bactérias vão ser colocadas em suspensão numa quantidade mínima de líquido.
   2. É possível testar uma única colónia se tiver, pelo menos, 1 mm de diâmetro ou testar várias colónias (3 ou 4) mais pequenas. NÃO COLHER/COLETAR COLÓNIAS CONFLUENTES.
   3. Evitar colher/coletar parte do meio sólido de cultura.
   4. O bacteriologista pode, nesta etapa, decidir semear outro meio de cultura para confirmar a pureza da amostra isolada.

B. **Identificação a partir de caldo de cultura.** O teste pode ser efectuado com caldos de cultura apropriados, como o caldo trypcase - soja ou o caldo cœur - cervelle, cuja turbidez deve ser superior ou igual a 1 McFarland. Podem ser utilizados caldos de cultura incubados a 37° C até um máximo de 24 h. Pipetar uma amostra de 50 µl da suspensão do caldo correctamente homogeneizado, para o tubo de Reagente Sonda seguindo as instruções do parágrafo PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

MATERIAL FORNECIDO

O AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA
bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 102865/2865

	20 Testes
Reagente Sonda (P)	10 x 2 tubos

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Ansas de 1 µl de plástico estéril, ansas metálicas, agulhas de plástico para colheita/coleta das colónias
Estirpes/cepas de controlo das culturas
Banho-maria ou bloco de aquecimento * (60° ± 1°C)
Micropipetas (50 µl, 300 µl)
Pipetas de repetição (50 µl, 300 µl)
Vortex

* Os orifícios do bloco de aquecimento devem estar adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Aconselha-se a utilização dos blocos de aquecimento GEN-PROBE.

MATERIAL SUPLEMENTAR DISPONÍVEL NO SEU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)
Bloco de aquecimento (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)
AccuProbe REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS
(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)

REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791-1791)

PROCEDIMENTO

A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

1. Regular o banho-maria ou o bloco de aquecimento a 60° ± 1°C.
2. Preparar o luminómetro GEN-PROBE. Assegurar-se de que a quantidade de reagentes de Detecção I e II é suficiente para efectuar todos os testes. Em caso contrário, encher os reservatórios do luminómetro consoante as instruções do Manual de Utilização

B. CONTROLOS

As estirpes/cepas de controlo positivo e negativo devem ser testadas por rotina em cada laboratório, em conformidade com a regulamentação em vigor. Pode utilizar-se uma cultura de *S. pneumoniae* (por exemplo, American Type Culture Collection, ATCC #33400) como controlo positivo e uma cultura de *Streptococcus bovis* (por exemplo, ATCC #33317) como controlo negativo.

C. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

1. Cortar horizontalmente a parte superior das saquetas/sachets de alumínio. Retirar o número necessário de tubos de Reagente Sonda para analisar as amostras e/ou as estirpes/cepas de controlo. Fechar bem a saqueta/sachet dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita cola ou com um clip. **Não retirar a saqueta/sachet que contém o dissecante.**
2. Identificar um número suficiente de tubos de Reagente Sonda para testar as amostras e/ou as estirpes/cepas de controlo. Tirar e conservar as tampas.
3. Pipetar 50 µl de Reagente 1 (Reagente de Lise) para os tubos de Reagente Sonda. **Se o teste for efectuado com estirpes/cepas isoladas a partir de caldo de cultura, não adicionar Reagente 1 aos tubos de Reagente Sonda**.
4. Transferir a amostra proveniente do meio sólido (uma colónia de pelo menos 1 mm de diâmetro ou colónias mais pequenas) ou 50 µl de caldo de cultura correctamente homogeneizado para os tubos de Reagente Sonda, seguindo as instruções descritas no parágrafo COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Se o teste for efectuado com uma cultura em meio sólido, agitar a ansa ou agulha no Reagente 1 (Reagente de Lise) e mexer cuidadosamente para colocar as células em suspensão.

D. HIBRIDIZAÇÃO

1. Pipetar 50 µl de Reagente 2 (Tampão de Hibridização) para todos os tubos de Reagente Sonda. Voltar a tapar os tubos e agitá-los manualmente ou num Vortex.
2. Incubar durante 15 minutos a 60° ± 1 °C no banho-maria ou no bloco de aquecimento.

E. SELECÇÃO

1. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Tirar e conservar as tampas. Distribuir 300 µl de Reagente 3 (Reagente de Selecção) em cada tubo. Voltar a tapar os tubos e agitá-los num Vortex para obter uma mistura homogénea.
2. Incubar os tubos de Reagente Sonda durante 5 minutos a 60° ± 1°C em banho-maria ou num bloco de aquecimento.

3. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento e deixá-los à temperatura ambiente durante, pelo menos, 5 minutos. Retirar e eliminar as tampas. **Ler os resultados no luminómetro durante a hora seguinte**.

F. DETECÇÃO

1. Seleccionar o protocolo apropriado no luminómetro.
2. Para retirar resíduos da superfície dos tubos, limpá-los com papel absorvente húmido. Em seguida, colocá-los no luminómetro e seguir as instruções.
3. Quando a análise tiver terminado, retirar os tubos do luminómetro.

NOTAS

A. REAGENTES: O Reagente 2 (Tampão de Hibridização) pode precipitar a 2° - 8°C. Aquecê-lo a 35° - 60°C e agitá-lo para dissolver o precipitado.

B. COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS: É importante colher/coletar as amostras provenientes de cultura em meio sólido numa zona onde haja colónias isoladas.

C. TEMPERATURA: A preparação da amostra, a hibridização e a selecção são reacções termodependentes. Consequentemente, é imperativo manter o banho-maria ou o bloco de aquecimento à temperatura preconizada.

D. DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES:

1. A reacção de hibridização deve ser iniciada nos 30 minutos a seguir à introdução da amostra e do Reagente 1 nos tubos de Reagente Sonda.
2. As reacções de hibridização e de selecção dependem do tempo. A hibridização deve durar, pelo menos, 15 minutos, mas não mais de 20 minutos. Durante a etapa de SELECÇÃO, incubar os tubos de Reagente Sonda durante, pelo menos, 5 minutos mas não mais de 6 minutos.

E. BANHO-MARIA: a água deve estar ao nível do anel de fecho dos tubos de Lise, não acima. Certificar-se de que a totalidade de líquido reaccional dos tubos de Reagente Sonda está bem imersa.

F. UTILIZAÇÃO DO VORTEX: é essencial dispor de uma mistura homogénea durante a etapa de SELECÇÃO, especialmente após a adição do Reagente 3.

G. RESOLUÇÃO DE INCIDENTES:

1. Podem observar-se valores de controlo negativo elevados (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317), superiores a 20.000 RLU (Relative Light Units) no LEADER ou a 600 PLU (Photometric Light Units) no AccuLDR (anteriormente PAL) se a homogeneização tiver sido insuficiente depois da adição do Reagente 3 (Reagente de Selecção), ou se estiverem presentes varios tipos de colónias. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.
2. Podem observar-se valores de controlo positivo fracos (*Streptococcus pneumoniae*, ATTCC #33400), inferiores a 50.000 RLU no LEADER ou a 1.500 PLU no AccuLDR (anteriormente PAL) se o número de microrganismos for insuficiente ou se o teste tiver sido efectuado com culturas mistas ou antigas ou ainda se as bactérias tiverem sido deixadas no Reagente 1 mais de 30 minutos antes da adição do Reagente 2. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.

RESULTADOS

A. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são interpretados em função de um valor limiar. As amostras que emitam um sinal luminoso de valor superior ou igual a este limiar são consideradas positivas. Os sinais luminosos inferiores a este limiar são considerados negativos. Quando o resultado se situar numa zona duvidosa, o teste deve ser repetido.

	AccuLDR (anteriormente PAL)	**LEADER**
Valor limiar	1.500 PLU	50.000 RLU
Zona duvidosa	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROLO DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Os controlos negativos (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317) e positivos (*Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400) devem estar dentro dos seguintes valores:

	AccuLDR (anteriormente PAL)	**LEADER**
Controlo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controlo positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITES DO TESTE

Este método foi testado com culturas frescas efectuadas em meios sólidos e com os caldos de cultura citados no parágrafo COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. O comportamento funcional deste teste praticado directamente com amostras clínicas não foi avaliado.

Os resultados do AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA devem ser interpretados conjuntamente com outros dados do laboratório e correlacionados com os dados clínicos.

VALORES ESPERADOS

O AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi comparado com métodos bioquímicos clássicos de identificação de cultura em dois locais, utilizando um total de 662 estirpes/cepas. Foram testadas: 305 estirpes/cepas de *S. pneumoniae*, 185 estirpes/cepas de outras espécies de estreptococos e 172 estirpes/cepas provenientes de 25 géneros diferentes. Foi efectuada uma identificação pelos métodos tradicionais (estudo da morfologia das colónias, coloração de Gram, teste da catalase, análise da actividade hemolítica em meio gelosado com 5% de sangue de carneiro, teste de sensibilidade à optoquina e solubilidade na bílis). As estirpes/cepas foram consideradas como positivas (≥ a 50.0000 RLU) ou negativas (< a 50.000 RLU). As culturas negativas deram resultados compreendidos entre 344 e 32.911 RLU e as culturas positivas deram resultados entre 59.223 e 863.193 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação figura abaixo:

AccuProbe / CULTURE

AccuProbe	**Pos**	**Pos**	**Neg**	**Neg**	**Sensibilidade/**	**Taxa de**
Cultura	**Pos**	**Neg**	**Pos**	**Neg**	**Especificidade**	**Concordância**
Local 1	202	0	0	212	100%/100%	100%
Local 2	103	0	0	145	100%/100%	100%
Total	**305**	**0**	**0**	**357**	**100%/100%**	**100%**

Todas as estirpes/cepas de *S. pneumoniae* deram resultados positivos e todas as outras estirpes/cepas deram resultados negativos com o AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. A sensibilidade, a especificidade e a taxa de concordância do teste são de 100%.

COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO TESTE

A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

A precisão intra-ensaio do AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *S. pneumoniae* 10 vezes numa mesma série.

Amostra	**A**	**B**
Número de ensaios	10	10
Resposta média (RLU)	101.292	56.025
Desvio-padrão	4.293	1.743
Coeficiente de variação	4,2%	3,1%

B. PRECISÃO INTER-ENSAIO

A precisão inter-ensaio foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *S. pneumoniae* ao longo de 12 séries distintas.

Amostra	**A**	**B**
Número de ensaios	12	12
Resposta média (RLU)	101.322	53.288
Desvio-padrão	3.660	1.776
Coeficiente de variação	3,6%	3,3%

C. ESPECIFICIDADE

Foram testadas 95 estirpes/cepas de cultura ATCC com o AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Estas estirpes/cepas compreendiam 78 espécies provenientes de 51 géneros diferentes. Foi testado um painel filogenético de 5 estirpes/cepas de *S. pneumoniae*, 24 estirpes/cepas de 13 outras espécies de estreptococos e 66 estirpes/cepas de 50 outros géneros. Apenas as estirpes/cepas de *S. pneumoniae* deram um resultado positivo com AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Com todos os outros microrganismos obtêve-se um resultado negativo com este dispositivo.

D. TESTE DE SOBRECARGA

Foram testadas sete séries de diluições de *S. pneumoniae* (de 3.000 a 30 milhões de microrganismos por diluição), na presença de 30 milhões de microrganismos pertencendo às espécies não alvo *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus bovis*. Não foi detectada nenhuma interferência nem reacção cruzada com AccuProbe STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA.

BIBLIOGRAPHY   BIBLIOGRAPHIE   LITERATUR   BIBLIOGRAFIA

1. **Centers for Disease Control**. 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
2. **Facklam, R.R., and R.B. Carey**. 1985. Streptococci and aerococci, p.154-175. *In* E.H. Lennette, *et al* (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. **Finegold, S.M., and E.J. Baron**. 1986. Streptococci, including enterococci and pneumococci, and aerococcus, p.366-387. *In* Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 7th ed. C.V. Mosby Company, Saint Louis, MO.
4. **Klainer, A.S.** 1983. Pneumococcal pneumoniae, p.3-9. *In* L. Weinstein, and B.N. Fields (ed.), Seminars in infectious disease V, 1 st ed. Thieme-Statton, Inc. New York, N.Y.
5. **Kohne, D.E., A.G. Steigerwalt, and D.J. Brenner**. 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus Legionella, p.107-108. *In* C. Thornsberry, *et al.* (ed.), Legionella: proceedings of the 2nd international symposium. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. **Musher, D.M**. 1988. The gram positive cocci: I. Streptococci. Hospital practise. **23**(3):63-76.



Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121 (USA)





Authorized Representative
EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

102946F-01 Rev. C 2011 - 03